

UNIVERSITE DE PARIS
Année 1969-1970

FACULTE DE PHARMACIE
Série n°

T H E S E

présentée

A LA FACULTE DE PHARMACIE
DE L'UNIVERSITE DE PARIS.

Pour l'obtention du titre de
DOCTEUR LE L'UNIVERSITE DE PARIS
(Mention Pharmacie) —

par

Michel PLISSIER

soutenue le

TITRE DE LA THESE

ETUDE DE LA PREPARATION
A PARTIR DE CULTURES CELLULAIRES D'ANTIGENES
VIRAUX COXSACKIE A et B UTILISES DANS LA REACTION
DE FIXATION DU COMPLEMENT.

Jury :

Mr. A. GERMAN	}	Président
Mr. P. TOURNIER		Examineurs
Mr. J. DILRY		



ADMINISTRATION

M.	MALANGEAU P.		DOYEN
M.	GUILLOT M. O+		Assesseur
M.	DELAVEAU P.		Assesseur
M.	RODINEAU L. +		Attaché principal A.U.
M.	JEANDEL L.		Attaché A.U.
Mme	ESPINASSE M.-L.		Attaché A.U.
M.	BRENN A.		Attaché A.U.
M.	JACOB A.		Attaché A.U.
Mme	MUR A.-M.		Attaché A.U.
Melle	FRIZOL E.		Attaché A.U.
M.	TRICAN J.-N.		Attaché A.U.

DOYEN HONORAIRE

M. VALETTE Guillaume O +

PROFESSEURS HONORAIRES

M.	LAUNOY L.		O +
M.	FLEURY P.		O +
M.	PICON M.		O +

PROFESSEURS

M.	JANOT M.M.	O+ Membre de l'Institut ..	Pharmacie Galénique (T)
M.	VALETTE G.	O+	Pharmacodynamie (T)
M.	PARIS R.	O+	Matière Médicale (T)
M.	GUILLOT M.	O+	Physique (T)
M.	GAUTIER J.A.	O+	Chimie Organique (T)
Melle	LAMBIN S.	+	Microbiologie (T)
M.	RAOUL Y.	+	Physiologie (T)
M.	COURTOIS J.	+	Chimie Biologique(T)
M.	DOMANGE L.	O+	Chimie Générale et Minérale (T)
M.	TRUHAUT R.	O+ Membre de l'Institut,	Toxicologie et Hygiène Industrielle(T)
M.	MORETTE A.	+	Hydrologie (T)



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552220_0025

M. CAVIER R. +.....	Parasitologie (T)
M. QUEVAUVILLER A. +.....	Hygiène & Education sanitaire(T)
M. MOREAU R. +.....	Pharmacie Chimique (T)
M. GERMAN A.	Microbiologie (T)
M. PIETTE M. +.....	Hématologie (T)
M. MALANGEAU P.	Chimie Analytique (T)
M. GIRARD M. +	Biochimie Appliquée (T)
M. DILLEMANN G.	Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie (T)
M. DEYSSON G. +.....	Botanique (T)
M. FLAHAUT J.	Minéralogie (T)
M. RENAULT J.	Chimie Organique (T)
M. LE HIR A.	Pharmacie Galénique (T)
M. BOUDENE C.	Toxicologie & Hygiène indus- trielle (T)
M. LARUELLE P.	Physique (T)
M. ROSSIGNOL P.	Pharmacodynamie (T)
M. MANGEOT A.	Pharmacie galénique industriel le (T)
M. DELAVEAU P.	Sémiologie & Pathologie générale (T)
M. COHEN Y	Pharmacodynamie (T)
M. RENAULT H.	Physique
M. BOURDON R.	Chimie Analytique
M. REYNAUD P.	Pharmacie chimique
M. LE MOAN R.	TOxicologie
M. POISSON J.	Pharmacie galénique
M. MICHEL R.	Endocrinologie (T)
M. LECLERC M.	Hématologie
M. PERCHERON F.	Chimie biologique
M. SAVEL J.	Biologie animale
M. DESVIGNES A.	Cryptogamie

MAITRES DE CONFERENCES

M. PAOLETTI C.	Toxicologie
M. BORY J.	Microbiologie
M. MIOCQUE M.	Chimie Organique
M. GUIGNARD J.-L.	Botanique Générale.

M. GOUNELLE J.C.	Physiologie
M. BINET P.	Biologie animale
M. COMBET-FARNOUX C.	Chimie organique
Mme PLAT M.	Législation & Déontologie Pharmaceutique
M. DELACOUX E.	Pharmacie chimique
M. DUCHON D.ENGENIERES M.	Chimie organique
M. ADOLPHE C.	Physique
M. GUERNET M.	Chimie analytique
M. DIDRY J.	Mathématiques appliquées aux Sciences expérimentales.
M. KHODADAD P.	Chimie minérale
M. PUISIEUX F.	Pharmacie Galénique
M. GUERIN H. chargé de cours...	Matière médicale
M. PERLES R. (dél.)	Chimie Biologique
M. YONGER J.(Dél.)	Chimie analytique
M. MESTRE J. (dél.)	Botanique
M. RIVET M. (dél.)	Chimie Générale et Minérale
M. HAZEBROUCQ G. (dél.)	Physique
M. BOURRINET P. (dél.)	Hygiène
M. ETIENNE J. (dél.)	Mathématiques
M. SOULEAU Ch. (dél.)	Chimie Générale et minérale
M. HAMON M. (dél.)	Chimie analytique
M. AGNERAY J. (dél.)	Biologie
M. DREUX C. (dél.)	Biochimie Appliquée.
M. ROUSSELET F. (dél.)	Chimie Analytique

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

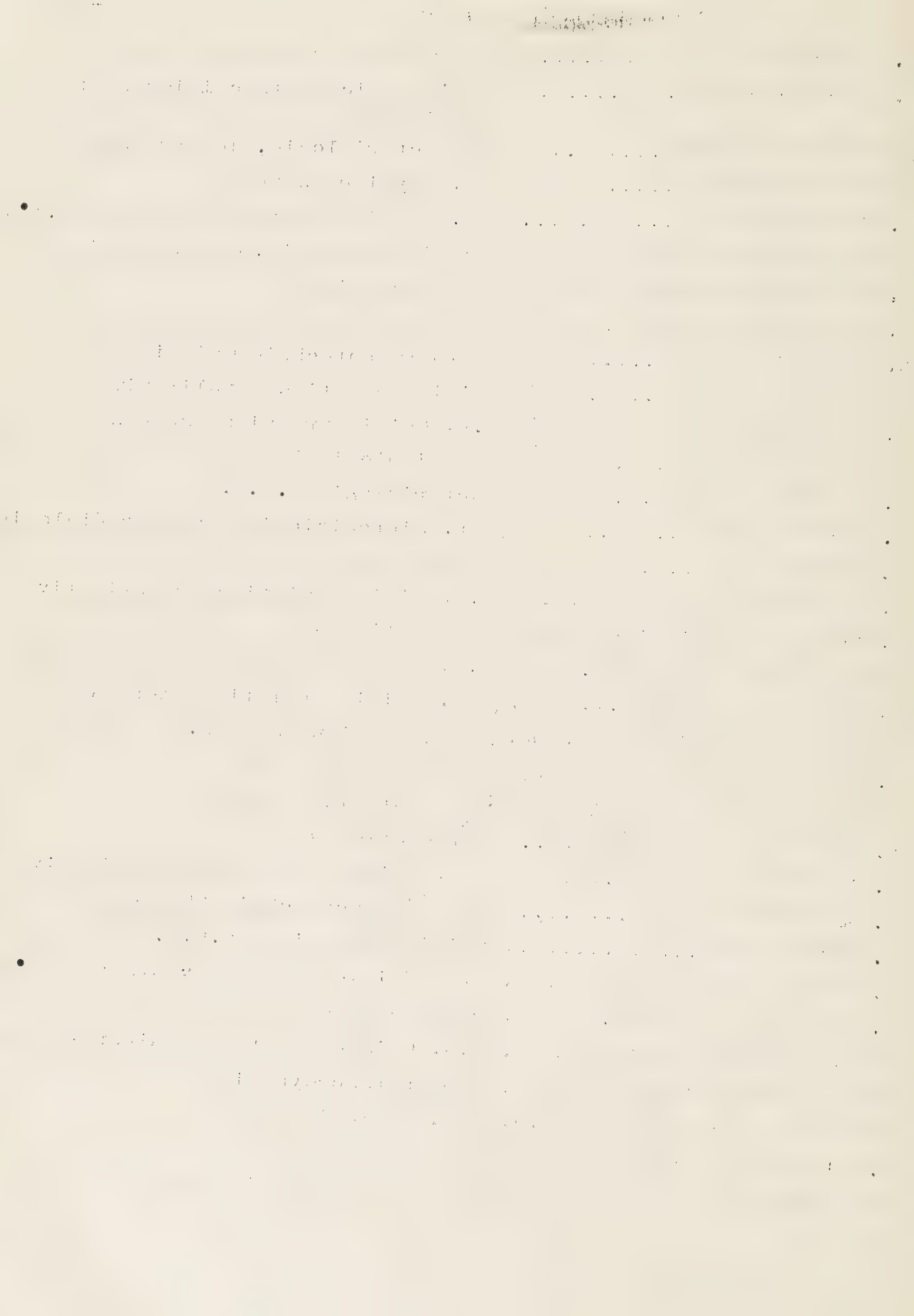
M. GESTEAU P. +
M. GUERIN H. +
Mme HARISPE M.
Melle LONGUEVALLE S.

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

(Liste alphabétique)

- M. ADAM Yves T.P. Pharmacie Chimique 5ème A.
- M. AYMARD Pierre E.D. Physiologie
- Melle BARNIER Suzanne (Dél.) .. Mathématiques
- Melle BERNARD Jacqueline Bactériologie 5ème A.
- M. BESANCON Pierre (Dél.) ... Mathématiques
- Mme BLANC Jeanine E.D. Chimie Organique Ière A.
- Mme BONALY Jacqueline (Dél.) E.D. Botanique Ière A.
- Melle BOURNIQUE Claude T.P. Physiologie Végétale
- M. BRALET Michel (Dél.) E.D. Zoologie Ière A.
- M. CANAL Jacques (Dél.) Biochimie appliquée 5ème A.
- M. CARLIER Alain CES Pharmacie Galénique Industrielle
- M. CARRE Daniel (Dél.) Mathématiques
- Melle CARRERE Clothilde T.P. Microbiologie 4ème A.
- M. CERCEAU Henri (Dél.) E.D. Chimie Minérale Ière A.
- Mme CHARPENTIER Madeleine .. E.D. Chimie Générale et Minérale
- M. CHERON J.-Marie (Dél.) .. T.P. Chimie Biologique
- Melle CHOIX Marguerite T.P. Pharmacie Galénique
- Melle CLAIR Geneviève E.D. Essais Médicaments Végétaux
- M. DAGRON Christian E.D. Chimie Générale et Minérale
- M. DAVY Jean (Dél.) CES Biochimie
- Melle DECAUDIN M.-Thérèse ... T.P. Parasitologie 4ème A.
- M. DELATTRE Jacques (Dél.) Biochimie Appliquée 5ème A.
- M. DELCOURTS Alain (Dél.) ... E.D. Botanique
- M. DOUSSIN Alexandre T.P. Chimie Analytique 5ème A.
- Melle DUMANT Geneviève CES Contrôle Médicaments (Physico-Chimie)
- Mme DUPONT Charlotte P.T. Pharmacodynamie
- M. ETIENNE Guy T.P. Pharmacie Galénique
- Mme FAURE Liliane E.D. Chimie Organique
- Melle FLEURY Solange E.D. Chimie Analytique Quantitative
2ème A.
- Melle FOGLIETTI Anne-Marie . T.P. Chimie Biologique
- M. GIRARDEAU François (Dél.) T.P. Chimie Organique 5ème A.
- M. GOBERT Jean (Dél.) T.P. Zoologie Ière A.
- Melle GOURSAT Marie-José ... E.D. Botanique Ière A.
- M. GROSSIORD J.-Louis (Dél.) T.P. Physique Ière A.
- Melle GUILLOUX Edith (Dél.) T.P. Chimie Biologique.

M. HARISPE Jean +..... T.P. Chimie Organique 2ème A
 M. HENRY Jacques Essais médicaments chimiques et galéniques
 Mme HUBERT Jeanne CES Bactériologie, Immunologie
 Mme JULIEN Maud E.D. Physique 2ème A
 M. JULIEN René E.D. Chimie Générale et Minérale, I•A
 Melle JUND Yvonne CES Microbiologie, Bactériologie
 M. LALLEGERIE Pierre (Dél.) CES Biochimie
 M. LAROCHE Jacques Hygiène Education Sanitaire
 M. LEOEUF Michel CES Pharmacotechnie Galénique
 Mme LEDUC Yvette Chimie Analytique Qualitative
 M. LEGENDRE Lucien (Dél.) .. T.P. Chimie Organique 2ème A
 Mme LEGER Nicole Parasitologie 5ème A
 M. LELUAN Georges Bactériologie C.E.S.
 M. LELUC Robert T.P. Microbiologie 5ème A & Biologie
 M. LEMAY René Législation
 M. LEMONNIER Alain T.P. Chimie Analytique Quantitative
 M. LEPAREUR Christian (Dél.) Mathématiques
 Mme LEQUANG Thuan (Dél.) ... T.P. Chimie Analytique Qualitative
 M. LEVILLAIN Pierre E.D. Chimie Analytique 1ère A
 Mme LEVY Françoise (Dél.) .. E.D. Botanique 2ème A.
 M. LIKFORMAN Joseph E.D. Physique 1ère A
 Melle LONGEVIALLE Monique ... E.D. Botanique 1ère A
 M. MACCARIO Jean (Dél.)..... Mathématiques
 M. MAHUZIER Georges T.P. Chimie Analytique Qualitative
 M. MANDEREAU Jean CES Pharmacotechnie Chimique
 M. MANET Léon Chimie Biologique C.E.S.
 M. MARTIN FRERE Henry T.P. Chimie Générale & Minérale 1•A
 M. MAUGUEN Yves (Dél.) Mathématiques
 Melle MICHELET Annick E.D. Chimie Générale & Minérale 2°A
 Melle MORIN Hélène CES Pharmacodynamie
 Mme MOURY Jacqueline (Dél.). T.P. Zoologie 1ère A
 M. N'GUYEN Phu Lich (Dél.).. CES Toxicologie
 Mme NOTTEGHEM M. Jacqueline.. T.P. Parasitologie 4ème A



B I B L I O T H E Q U E

Melle RUYSSSEN Y. + Conservateur en Chef
Mme DESGRIPPES A. Conservateur
Melle BOUVRESSE A.M. Bibliothécaire
Mme COULET M.A. Bibliothécaire
Melle LANGLOIS C. Bibliothécaire

Légion { + Chevalier
d'Honneur { 0 Officier
 { C Commandeur

Paris, le 15 Janvier 1969

A Monsieur A. GERMAN

Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris
Membre de l'Académie de Pharmacie

qui a bien voulu nous faire l'honneur
de présider cette thèse

A Monsieur P. TOURNIER

Professeur à la Faculté de Médecine de Paris

A Monsieur J. DIDRY

Maître de Conférence à la Faculté de Pharmacie de Paris

qui ont accepté de juger ce travail.

En hommage de respectueuse gratitude.

ETUDE DE LA PREPARATION
A PARTIR DE CULTURES CELLULAIRES
D'ANTIGENES VIRAUX
COXSACKIE A & B
UTILISEES DANS LA REACTION DE
FIXATION DU COMPLEMENT.

I N T R O D U C T I O N

La place de la Virologie commence à devenir importante dans la pratique de la biologie clinique.

Cependant, l'isolement et l'identification des virus ne sont pratiqués que par un nombre restreint de Laboratoires, surtout hospitaliers ou publics, à cause surtout de la nécessité d'utiliser des cultures cellulaires.

Les Cliniciens et les Epidémiologistes sont extrêmement intéressés par l'identification rapide du virus en cause, lors d'une épidémie.

En ce qui concerne les Entérovirus, nous avons constaté, depuis trois ans, une évolution très intéressante dans la place respective occupée par les trois groupes principaux : poliovirus, coxsackievirus,

Echovirus.

En effet, si en 1967, nous avons isolé,
27 Poliovirus, 9 coxsackie et 4 Echo,

en 1968, nous avons isolé,
13 Poliovirus, 22 coxsackie et 4 Echo,

et en 1969 (jusqu'au 1er Octobre)
1 Poliovirus, 27 coxsackie et 8 Echo.

Ainsi, la place prépondérante du Poliovirus devient minime et il est remplacé par le Coxsackievirus.

Plusieurs virologues ont fait les mêmes constatations et les épidémiologistes sont vivement intéressés.

Nous avons eu fin 1968 et en 1969, une épidémie de Coxsackie A 21, une épidémie de Coxsackie B1 et une d'échovirus 6, ainsi que le fait ressortir le tableau des types isolés.

	Poliovirus		Coxsackie A			Coxsackie B				Echovirus			
	1	3	9	21	23	1	2	4	5	6	11	12	21
1967	9	18	3			2		3	1			6	1
1968	9	4	3	7		1	2	3	4		3	1	
1969	1		1	15	3	6	2			8			

Etant donné l'importance croissante des Coxsackie virus dans notre pratique journalière de la virologie, nous avons été obligés d'entreprendre la préparation d'un certain nombre d'antigènes viraux de ce groupe pour la réaction de fixation du complément, ces antigènes n'étant pas commercialisés. Nous avons, de ce fait, été conduits à essayer les différentes méthodes de préparation décrites et à mettre au point une modification qui nous paraissait plus avantageuse.

Il nous a semblé intéressant d'effectuer une étude expérimentale comparée de ces méthodes et de déterminer, au moyen de l'analyse statistique, s'il y a

une différence significative entre les résultats qu'elles nous permettent d'obtenir. C'est ce qui constitue la partie originale personnelle de ce travail.

Le plan que nous suivons dans cet exposé, est le suivant :

PREMIERE PARTIE

Généralités :

- I- Notions sur les Coxsackie virus
 - A) les Virus
 - B) leur Pouvoir pathogène chez l'homme.
- II- Le Diagnostic de Laboratoire
 - A) Isolement et Identification du virus
 - a) inoculation aux souriceaux nouveau-nés et identification
 - b) inoculation en cultures cellulaires et identification,
 - B) Titrage des anticorps
 - a) neutralisation du virus,
 - b) fixation du complément.

DEUXIEME PARTIE

Préparation des antigènes

- I- Méthode avec ultracentrifugation,
- 2- Méthode récente de Schell, Huebner et Turner,
- 3- Modification personnelle de cette méthode.

TROISIEME PARTIE

Etude expérimentale comparée de ces trois méthodes

I. Plan de l'Expérience

- A- Préparation des Suspensions virales
- B- Extraction
- C- Titrages.

2. Matériel

3. Techniques

4. Résultats

5. Analyse des résultats

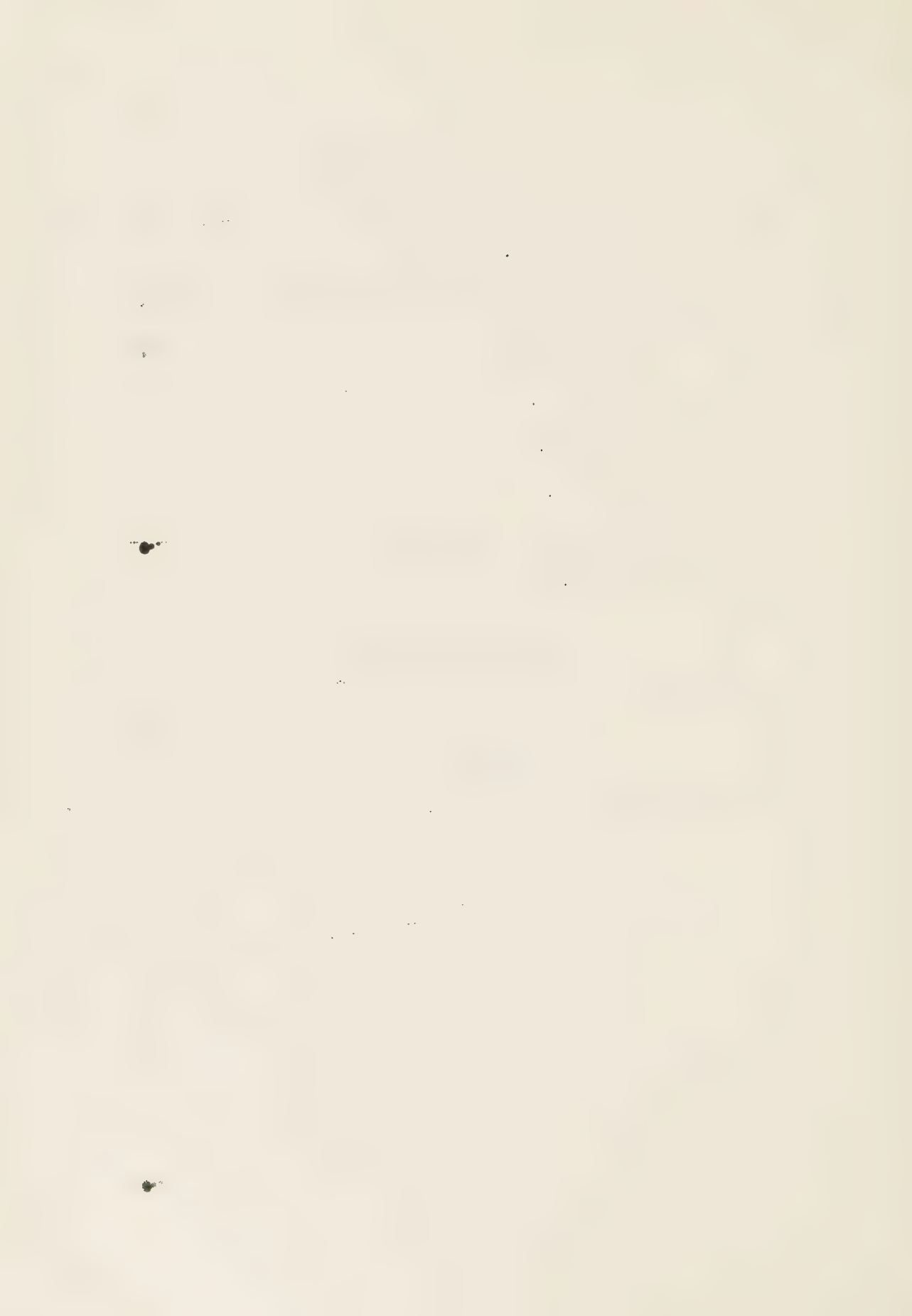
6. Discussion.

QUATRIEME PARTIE

Conclusion.

CINQUIEME PARTIE

Bibliographie.



PREMIERE PARTIE

Généralités

I- NOTION SUR LES COXSACKIE VIRUS :

A- Les virus.

La connaissance biochimique et biophysique plus approfondie des virus a permis d'effectuer des tentatives de classification. Le Comité des Entérovirus a décidé de donner le nom de Picornavirus à un groupe de virus de petite taille : entre 20 et 30 m μ contenant du R N A, non inactivés par l'éther, le chloroforme ou le déoxycholate de sodium, ni par le séjour de 30 minutes à + 50° (en présence d'ion Mg++) et ayant un petit nombre de capsomères.

Parmi ces Picornavirus, l'on distingue :

- les entérovirus stables à pH 3,
- les rhinovirus non stables à pH 3.

a) les Coxsackie virus appartiennent à la famille des entérovirus, comme les poliovirus et les echovirus. Leur taille est de 28 m μ de diamètre, leur densité de 1,34.

C'est en 1948, aux Etats Unis que Dalldorf et Sickles (1) isolèrent un nouvel agent filtrable en inoculant à des souris des extraits de matières fécales de deux enfants atteints de syndromes paralyti-

ques. Pour désigner cet agent non pathogène pour le singe, Dalldorf proposa le terme de "Virus de Cocksackie" du nom du village de l'Etat de New York où vivaient les enfants.

En 1949, Melnick et Coll (2) ont isolé à leur tour en Nouvelle Angleterre un virus similaire mais non identique à l'agent de Dalldorf. L'on a pu imputer au Cocksackie virus la pleurodynie ou maladie de Bornholm. Cette affection a été individualisée par Sylvest (3) à l'occasion d'une épidémie ayant sévi dans l'île Danoise de Bornholm. La Pleurodynie ou maladie de Bornholm est très largement répandue dans le monde et l'on a pu mettre en évidence des coxsackie virus dans les sécrétions pharyngées et les selles des malades lors de plusieurs épidémies.

Ils sont hautement pathogènes pour le souriceau nouveau-né, bien que les souches récentes de certains types se multiplient de préférence en cultures cellulaires de rein de singe.

Bien que tous puissent induire la formation d'anticorps chez les souris de tous âges, ils ne sont aptes à produire des symptômes caractéristiques ou la mort que chez les souriceaux nouveau-nés. Les chimpanzés et les cynomolgues peuvent être infectés subcliniquement,

le virus apparaît alors dans le sang et la gorge pendant peu de temps, et est excrété dans les fèces pendant deux à cinq semaines. Le type A 14 a été adapté pour produire des lésions semblables à la poliomyélite chez la souris adulte et le singe. Ce virus adapté, inoculé au souriceau produit seulement de la myosite.

Des souches du type A 7 produisent une paralysie et de sévères lésions du système nerveux central chez le singe. Un type, le A 2, est multiplié en oeuf fertile. Les types du groupe B se multiplient facilement en cellules K B ou Héla, amnios et rein de porc, plusieurs types du groupe A, A9, A21 se multiplient en cellules K B ou amniotiques, d'autres tels A2, 3, 4, 7, 8, 10, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 22, 24, en cellules de rein de singe ou amniotiques.

L'Histologie et la Clinique permettent de répartir ces virus en deux groupes :

- ceux du groupe A sont caractérisés par leur aptitude à provoquer une myosite des muscles striés chez le souriceau nouveau-né, sans autre lésion observable, accompagnée d'une paralysie flasque.
- ceux du groupe B provoquent une encéphalite avec paralysie spastique et aussi une stéatite nécrosante.

Au moins 24 Cocksackie A et 6 Cocksackie B ont été isolés. Ces différents types immunologiques ont été

mis en évidence au moyen de neutralisations croisées chez le souriceau, d'épreuves croisées de fixation du complément, d'épreuves de protection croisées chez des souriceaux nés de mères immunes, etc... Des variants antigéniques surviennent pour chacun des virus du groupe B.

Le type B 3 produit une hémagglutinine pour les hématies humaines O et les autres membres du groupe B ont des hémagglutinines pour les hématies du singe.

b)- le pouvoir pathogène des Cocksackie virus chez l'homme est très varié, les virus peuvent être retrouvés dans les selles, l'oropharynx, les urines, le L.C.R. pendant la phase aigue de la maladie. L'ascension ou l'apparition d'anticorps spécifiques dans deux prélèvements effectués l'un au 5ème jour environ l'autre 15 à 20 jours après le début de la maladie, permet de mettre en évidence une immunisation active et spécifique.

Le rôle étiologique des coxsackie virus a été mis en évidence dans les affections suivantes :

1° - Pharyngite vésiculeuse

Cette affection aigue, décrite aussi sous le nom d'Herpangina est provoquée essentiellement par des Cocksackie virus A.

2° - Syndromes fébriles mineurs

L'on réunit sous ce nom un ensemble d'affections

telles que grippe estivale, fièvre dite des trois jours, avec rhinopharyngite, coryza. Elles sont dues essentiellement aux Cocksackie virus A.

3° - Pleurodynie ou myalgie épidémique se manifeste surtout par de la fièvre, des douleurs thoraciques et des céphalées. L'évolution est bénigne, cette affection est due aux virus du groupe B.

4° - Méningites aseptiques et paralysies transitoires. Ces syndrômes sont causés par tous les types du groupe B et les types A 7 et A 9 .

5° - Myocardite ou Encéphalomyocardite du nouveau né, grave le plus souvent fatale, est causée par les virus du groupe B. Nous avons isolé dans notre Laboratoire, dans le myocarde de deux enfants morts de myocardite, une cocksackie B 5 et un cocksackie B 2.

6° - Coryza

Outre les rhinovirus, l'on a mis souvent en cause les cocksackie A 21, A 24, B 3.

II- LE DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE -

Il est compliqué, long et coûteux. Il nécessite l'isolement et l'identification du virus et aussi l'ascension du taux des anticorps spécifiques du virus isolé.

A- Isolément et identification du virus,

Deux procédés sont employés - l'idéal est de les employer simultanément :

a)- inoculation au souriceau nouveau-né, c'est le procédé de choix, le plus ancien d'ailleurs, celui qui a permis à DALLDORF et SICKLES (1) d'isoler le virus en 1948. Si les coxsackie B sont isolés facilement en culture cellulaire, ainsi que les A 9, A 21, A 23, la plupart des autres types A le sont difficilement. Il faut avoir recours au souriceau. Les signes cliniques apparaissent dans les 3-8 jours pour le groupe A et dans les 5-14 jours pour le groupe B.

Le diagnostic de groupe est fait par les lésions anatomopathologiques. Le typage est effectué, après titrage du pouvoir infectieux de la carcasse broyée. On neutralise la suspension de carcasse avec des sérums spécifiques avant de l'injecter à des animaux.

L'on peut identifier le virus par la réaction de fixation de complément en utilisant le broyat de carcasse comme antigène et des sérums spécifiques étalons.

b)- inoculation en culture cellulaire, c'est ce procédé que nous utilisons dans notre laboratoire de virologie. Après avoir traité le prélèvement par le chloroforme pour éliminer les bactéries et les virus

contenant des lipides, nous inoculons des cultures de cellules K B et des cellules amniotiques. La plupart des auteurs utilisent le rein de singe. Dès l'apparition d'un effet cytopathogène viral, le virus est classé, soit par les lésions cytologiques qu'il provoque en cultures cellulaires, dans des tubes à lamelles de Leighton, soit par l'étude de sa résistance à divers agents physico-chimiques, c'est le procédé que nous employons.

Nous déterminons la résistance du virus, par titrage par rapport à un témoin, à la suite d'un traitement par :

- chauffage 30 minutes à 50°
- chauffage 30 minutes à 50° + $MgCl^2$
- pH 3
- chloroforme.

Les techniques détaillées sont les suivantes :

a) la culture cellulaire infectée est congelée à - 20° et décongelée à la température ordinaire. La totalité de la suspension cellulaire est centrifugée 10 minutes à 3.000 tours minute dans un centrifugeur Jouan A B.

b) 0,4 ml de surnageant est dilué avec 3,6 ml de milieu lactalbumine - Levure de Melnick (4)

c) à partir de la dilution au 1/10 du surnageant l'on répartit :

- 1) 0,5 ml + 0,5 ml de solution 2 M de $MgCl^2$ dans de l'eau distillée. 30 minutes à + 50°
- 2) 0,5 ml + 0,5 ml milieu Lactalbumine-levure 30 minutes à + 50°
- 3) 1 ml + 0,10 ml de chloroforme, on agite 10 minutes, on décante le surnageant que l'on dilue au demi avec du milieu Lactalbumine-levure (4)
- 4) 0,9 ml + 0,1 ml de H cl N dans une solution tampon pH 3. contact 3 heures à + 20°. On dilue au demi avec une solution tampon pH 7,4.

5) 0,5 ml + 0,5 ml milieu Lactalbumine Levure

d) l'on effectue sur 1, 2, 3, 4 et 5 un titrage⁽⁴⁾ des virus résiduels en tube de culture cellulaire. dilution logarithmique de base 10, 2 tubes par dilution.

e) une différence de titre supérieure à 0,5 log entre le témoin 5 et l'un des traités traduit une inactivation par l'agent physico-chimique correspondant.

Le typage est effectué par neutralisation en tubes de cultures cellulaires.

B- Le titrage des anticorps

Il s'effectue soit par neutralisation en cultures cellulaires de 100 doses infectantes 50 % de virus, soit par fixation du complément.

a)- Titrage par neutralisation.

C'est certainement la méthode de choix car les anticorps sont spécifiques de type.

Les anticorps neutralisants, s'ils apparaissent en même temps que les anticorps fixant le complément lors des infections à entérovirus, selon Melnick (5), persistent beaucoup plus longtemps, plusieurs années, alors que ceux fixant le complément persistent rarement plus de six mois.

De ce fait, la présence d'anticorps fixant le complément est plus significative d'infection récente que la constatation d'anticorps neutralisants. Mais dans les deux cas, seule l'augmentation du taux des anticorps ou leur apparition dans un sérum précoce et un sérum tardif permet de diagnostiquer une infection en cours. Comme la plupart des virologues, Sohler (6) pense que l'on ne pourra admettre que le virus est en cause dans le déterminisme de l'infection. que si l'on trouve dans le sérum tardif un titre au moins quatre fois supérieur au précédent, étant entendu que les titrages des deux sérums sont effectués simultanément, dans la même réaction.

Les inconvénients de la méthode de titrage des anticorps par neutralisation sont nombreux du fait de la nécessité d'utiliser des cultures cellulaires, de vérifier le titre de la suspension virale à 100 DL 50 et du délai de plusieurs jours nécessaire pour avoir le résultat.

b)- Titrage par fixation du complément.

Les anticorps fixant le complément s'ils sont parfois spécifiques de types, ne sont le plus souvent que des anticorps de groupes de virus. En outre, ils peuvent donner des réactions croisées, notamment entre les différents types Cocksackie B et des Echo tels Echo 6.

Malgré ses inconvénients par rapport à la neutralisation, cette méthode nous paraît très intéressante, car :

- elle est rapide
- d'exécution facile,
- peu coûteuse,
- se prête bien au travail en série et spécialement aux enquêtes épidémiologiques.

Il arrive également très fréquemment que les cliniciens demandant une exploration sérologique virale et la fixation du complément permet seule d'exécuter ce travail qui, par neutralisation, serait disproportionné

à l'intérêt des renseignements obtenus.

En particulier, pour le groupe Cocksackie A, la réaction étant spécifique de type et les types étant très nombreux, sa rapidité d'exécution la rend précieuse.

Pour le groupe B où les types ne sont qu'au nombre de six et où, malgré l'absence d'antigène de groupe, il existe une certaine parenté antigénique, on peut lui préférer la neutralisation. Pour notre part, même pour le groupe B, nous pratiquons la fixation du complément et n'avons trouvé que très rarement des réactions croisées.

DEUXIEME PARTIE

Préparation des antigènes.

I - Méthode avec Ultracentrifugation

De très nombreuses méthodes ont été décrites, employant des procédés physiques ou chimiques, ou une combinaison des deux. Nous avons utilisé une méthode comportant des congélations et décongélations des cellules et ultracentrifugation, mais ne comportant pas de traitement par le Fréon 112.

Mode opératoire :

- des cultures jeunes de cellules KB en boîtes de Roux de 1 litre, avec le milieu Lactalbumine - Levure de Melnick (4), sans sérum de veau, sont ensemencées avec une forte concentration de virus.
- dès l'apparition d'un Effet cytopathogène complet, on congèle à -70° et décongèle à $+37^{\circ}$ 6 fois les boîtes de Roux contenant le milieu de survie.
- la totalité du contenu des boîtes est rassemblé, agitée, inactivée par la Béta Propiolactone à 0,5 %, neutralisée à pH 7, puis répartie dans des tubes du rotor 50 d'une Ultracentrifugeuse L Spinco Beckman.
- les tubes sont centrifugés 1 heure à 40.000 tours par minute, soit $127.000 \times g$.
- le surnageant est écarté
- le culot est remis en suspension dans 1 ml du surnageant

- écarté et placé dans un tube à hémolyse froid.
- on congèle à $- 70^{\circ}$ et décongèle à $+ 37^{\circ}$ 6 fois.
 - les tubes sont centrifugés 10 minutes à 3.000 tours minute avec un centrifugeur Jouan AB.
 - le surnageant constitue l'antigène qui a été concentré 10 fois.

II- Méthode récente de Schell, Huebner et Turner (7)

Ces auteurs ont publié en 1966 une méthode de concentration des antigènes viraux fixant le complément. Le principe de cette méthode consiste à concentrer les cellules porteuses de virus par centrifugation à faible vitesse avant d'en extraire les virus.

Pereira et Valentine (8), Wilcox et Guisberg (9)

F. Artzt (10) avaient déjà montré le bien fondé de ce principe mais Schell, Hueber et Turner (7) l'ont appliqué à la préparation d'antigènes viraux, fixant le complément d'un titre élevé, pour une grande variété de virus. Cette préparation met en oeuvre les méthodes usuelles de Laboratoire. Nous avons suivi le protocole de ces auteurs sauf sur un point : il nous a été impossible d'homogénéiser une minute au "Virtis" 45, lors du dernier stade, ne possédant pas cet appareil.

Mode opératoire

- des cultures jeunes de cellules KB en boîtes de Roux de 1 litre, avec le milieu Lactalbumine - Levure de Melnick (4) sans sérum de veau, sontensemencées avec

une forte concentration de virus.

- dès l'apparition d'un effet cytopathogène complet, on décolle la totalité des cellules en grattant au besoin avec un agitateur de verre stérile dont l'extrémité est recouverte d'élastomère de Silicone.
- la totalité du contenu des boîtes est rassemblée, agitée, inactivée 2 heures par la Béta propiolactone à 0,5 %, neutralisée à pH 7.
- 10 ml de la suspension sont mis dans chaque pot à centrifuger froid. On centrifuge 10 minutes à 1.000 tours avec un centrifugeur Couprie.
- on met à part le surnageant
- on remet le culot en suspension dans 1 ml de surnageant
- on congèle à -70° et décongèle à $+37^{\circ}$ 6 fois.
- on centrifuge 10 minutes à 1.000 tours avec un centrifugeur Couprie. Le surnageant est l'antigène.

III- Modification personnelle de cette méthode

En étudiant les résultats obtenus par Schell, Huebner et Turner, nous avons remarqué que lorsque ces auteurs concentrent vingt fois la suspension cellulaire au lieu de dix fois, le titre de l'antigène obtenu n'est pas deux fois plus élevé. Aussi avons-nous voulu essayer de concentrer deux fois seulement la suspension cellulaire d'origine.

Mode opératoire

- des cultures jeunes de cellules KB en boîtes de Roux de 1 litre, avec le milieu Lactalbumine - Levure de Melnick (4), sans sérum de veau, sont ensemencées avec une forte concentration de virus.
- dès l'apparition d'un effet cytopathogène total, l'on décolle la totalité des cellules en grattant la nappe au besoin avec un agitateur de verre, dont l'extrémité est recouverte d'élastomère de Silicone.
- 10 ml de suspension cellulaire par pot sont centrifugés dans des pots refroidis. 10 minutes à 1.000 tours par minute avec un centrifugeur Couprie.
- le surnageant est mis de côté.
- le culot cellulaire est remis en suspension dans 5 ml de surnageant - soit 50 % - de façon à avoir une concentration 2X. On inactive avec 0,5 % de Béta Propiolactone pendant 2 heures, puis on neutralise à pH 7.
- on congèle à - 70° et décongèle à + 37° six fois
- on centrifuge 10 minutes à 6.000 tours par minute pour clarifier ; le surnageant constitue l'antigène.

TROISIEME PARTIE

Etude Expérimentale comparée de ces trois méthodes.

I- Plan de l'expérience

Le plan de l'expérimentation a été conçu de façon à permettre l'analyse statistique des résultats au moyen de l'analyse de variance avec décomposition des effets.

L'expérimentation a consisté à comparer les trois méthodes d'extraction décrites ci-dessus en les appliquant à 4 virus Cocksackie :

Virus Cocksackie A 9 et A 21

Virus Cocksackie B 2 et B 5

Schell, Huebner et Turner (7) n'avaient pas essayé leur méthode pour la préparation des antigènes Viraux Cocksackie.

Pour chacun des 4 virus, l'étude des 3 procédés d'extraction a été effectuée de façon rigoureusement identique, l'ordre dans lequel les virus ont été étudiés a été fixé au hasard, ce qui fait que chaque expérimentation concernant un virus peut être utilisée comme un bloc casualisé.

Le détail du plan expérimental, pour chaque virus est le suivant :

A- Préparation des suspensions virales.

- les cellules KB jeunes de 4 boîtes de Roux de 1 litre sont ensemencées avec 10 ml de suspension virale titrant 10^{*5} de virus par boîte. Dès l'apparition de l'effet cytopathogène total, qui a lieu

pratiquement au même moment, les cellules sont décollées, au besoin en s'aidant d'un grattage.

Les suspensions cellulaires : cellules + milieu sont rassemblées dans un même récipient, à + 4°, bien mélangées, et réparties à raison de 12 ml, dans 30 flacons stériles numérotés de 1 à 30.

B- Distribution des flacons.

- au moyen d'une table de nombres au hasard, on tire au sort :

10 flacons pour la méthode A

10 flacons pour la méthode B

10 flacons pour la méthode C

C- Extraction.

- l'on pratique alors, en suivant le protocole indiqué précédemment :

10 extractions selon la méthode A

10 extractions selon la méthode B

10 extractions selon la méthode C

D- Titrages.

- l'on titre alors, simultanément, le jour même des extractions, les 3 lots - 1 pour chaque méthode de dix flacons d'antigène.

Le titrage de l'antigène fixant le complément est effectué avec des dilutions croissantes géométriques de bases 2 d'antigène contre la même dilution

de sérum spécifique étalon. La dilution de sérum est celle représentant le titre de ce sérum. Les 30 titrages sont effectués dans un ordre déterminé par tirage au sort. Nous avons déterminé également la spécificité des antigènes au moyen de divers sérums anti Coxsackie B, A et Echo.

II- Matériel.

A - Cultures cellulaires

Les boîtes de Roux sont en verre Pyrex.

Les bouchons en chlorure de Polyvinyle exempt de charges (Verneret)

B - Extraction.

L'Ultracentrifugation est effectuée au moyen d'une Ultracentrifugeuse Spinco Beckman L, rotor 50; les tubes sont en polypropylène.

Les centrifugations à faible vitesse sont effectuées avec une centrifugeuse Couprie et une centrifugeuse Jouan. La verrerie est Pyrex.

C - Titrages.

Effectués en microplaques plastiques Greimer, fond en U. Dilution au moyen d'une micropipette automatique Marburg 25 μ l, de micropipettes Rossignol 0,025 ml.

Sérum Hémolytique et Hématies de Mouton proviennent de l'Institut Pasteur.

III- Techniques.

La technique suivie jusqu'aux extractions comprises a été indiquée en détail en 2ème partie de cet exposé. Il faut mentionner cependant que les cellules KB ont été multipliées en milieu Lactalbumine -Levure de Melnick (4) contenant 5 ‰ d'Hydrolysât de Lactalbumine. 1,5 ‰ d'extrait de levure. 2,2 ‰ de Bicarbonate de Sodium. 3,5 ‰ de glucose, en solution saline de Earle; + 10 % sérum de veau, sans antibiotiques. Le milieu de survie étant aussi du Lactalbumine-Levure sans sérum de veau et sans antibiotiques.

Les titrages ont été effectués selon la méthode de Kolmer comportant la fixation du complément durant une nuit à + 4°. La technique est une microtechnique utilisée dans le Laboratoire du Professeur Chany à Saint-Vincent de Paul à Paris.

Les réactions sont effectuées sous les volumes suivants :
(tampon Véronal pour les dilutions).

- dilution d'antigène	0,025 ml
- complément. 2 unités	0,025 ml
- sérum	0,025 ml
- sérum Hémolytique. 2 unités	0,025 ml
- Hématies à 2 %	0,025 ml

Le complément de cobaye lyophilisé provient de l'Institut Pasteur, il est titré ainsi :

0,025 ml de complément dilué du 1/15 au 1/130 + 0,05 d'eau isotonique + 0,025 de sérum Hémolytique dilué au 1/300 + 0,025 de suspension à 2% d'Hématies de mouton, sont répartis dans une microplaque fond en U. Après 30 minutes à 37° et 1 heure à + 4°, on lit le titrage. Le titre est représenté par la plus haute dilution de complément donnant une hémolyse totale et constituant une unité de complément.

Les quatre souches virales ont été isolées dans notre Laboratoire. Les sérums étalons sont des sérums humains provenant de notre laboratoire, prélevés chez des malades chez lesquels ont été isolés les virus étudiés et ayant manifesté une élévation significative du taux de leurs anticorps spécifiques de ces virus, O.G.Gaudin (11) déconseille les sérums humains à cause de leur richesse en anticorps différents anti-viraux qui nuit à leur spécificité. Cependant Schell, Huebner et Turner (7) ont employé des sérums humains, et nous avons pratiqué un contrôle de la spécificité de nos sérums et antigènes. Tous les virus et les sérums utilisés ont été contrôlés avec des sérums et des virus provenant du Laboratoire du Professeur Delpy, Hopital Maritime Sainte Anne de Toulon ou du Docteur Maurin, de l'Institut Pasteur de Paris.

IV- Résultats

Pour plus de commodité, nous utiliserons les abréviations suivantes pour désigner les extractions : A : méthode avec ultracentrifugation. B : méthode de Schell, Huebner et Turner. C : notre modification de cette dernière méthode.

T : titres (inverse de la dilution d'Antigène)

T2 : titre au carré

A- Virus Cocksackie A 21

Titre des antigènes pour chacune des dix extractions par méthode :

A		B		C	
T	T2	T	T2	T	T2
8	64	0		64	4.096
8	64	0		64	4.096
8	64	0		64	4.096
4	16	0		64	4.096
4	16	0		64	4.096
4	16	0		64	4.096
4	16	0		64	4.096
4	16	0		64	4.096
4	16	0		64	4.096
4	16	0		64	4.096
52	304	0		640	40.960

Signification de la différence des titres antigéniques des trois groupes au moyen de l'analyse de variance avec décomposition des effets entre groupe.

Données

$$S X = 52 + 0 + 640 = 692$$

$$S X^2 = 304 + 0 + 40.960 = 41.264$$

$$n = 10 \times 3 = 30$$

Calculs

$$\text{I/ terme de correction} = C = \frac{(SX)^2}{n} = \frac{(692)^2}{30} = 15.962$$

II/ variation totale

$$\text{somme des carrés} = SX^2 - C = 41.264 - 15.962 = 25.302$$

$$DL = 30 - 1 = 29$$

III/ variation entre groupes

$$\begin{aligned} \text{somme des carrés} &= \frac{(SA)^2}{10} + \frac{(SB)^2}{10} + \frac{(SC)^2}{10} - C = \\ &= \frac{(52)^2}{10} + \frac{(0)^2}{10} + \frac{(640)^2}{10} - C = 41.230 - 15.962 = 25.268 \end{aligned}$$

$$DL = 3 - 1 = 2$$

IV/ A contre B + C

Somme des carrés

$$\frac{(52)^2}{10} + \frac{(640)^2}{20} - C = 20.480 - 15.962 = 4.518$$

$$DL = 2 - 1 = 1$$

V/ B contre C

$$\begin{aligned} \text{Somme des carrés} &= \text{entre groupes} - A \text{ contre } B + C = \\ &= 25.268 - 4.518 = 20.750 \end{aligned}$$

$$DL = 2 - 1 = 1$$

VI/ Variation à l'intérieur des groupes. (Erreur)

$$\begin{aligned} \text{Somme des carrés} &= S X^2 - \left(\frac{(SA)^2}{10} + \frac{(SB)^2}{10} + \frac{(SC)^2}{10} \right) = \\ &= 41.264 - 41.230 = 34 \end{aligned}$$

$$DL = 30 - 3 = 27$$

Tableau d'analyse de variance

	Source de variation					
	Somme des carrés	DL	Carré moyen	F	5 %	1 %
I- Entre groupes	25.268	2	12.694	10.027	3,35	5,49
II- A contre B + C	4.518	1	4.518	3.585	4,21	7,68
III- B contre C	20.750	1	20.750	16.468	4,21	7,68
IV- Erreur	34	27	1,26			

Nous voyons que la différence de titre antigénique entre :
 - Extraction A et Extraction B + C est hautement significative.

- Extraction B et Extraction C est hautement significative.

B - Virus Coxsackie A9

A		B		C	
T	T2	T	T2	T	T2
128	16.384	100	10.000	100	10.000
50	2.500	100	10.000	150	22.500
128	16.384	100	10.000	150	22.500
100	10.000	64	4.096	100	10.000
128	16.384	100	10.000	100	10.000
100	10.000	64	4.096	100	10.000
100	10.000	50	2.500	50	2.500
100	10.000	50	2.500	50	2.500
100	10.000	50	2.500	100	10.000
100	10.000	50	2.500	100	10.000
<u>1034</u>	<u>111.652</u>	<u>728</u>	<u>58.192</u>	<u>1000</u>	<u>110.000</u>

signification de la différence des titres antigéniques

des trois groupes au moyen de l'analyse de variance avec décomposition des effets entre groupes.

Données

$$S X = 1.034 + 728 + 1000 = 2.762$$

$$S X^2 = 111.652 + 58.192 + 110.000 = 279.844$$

$$n = 10 \times 3 = 30$$

Calculs

$$\text{I/ Terme de correction} = C = \frac{(SX)^2}{n} = \frac{(2762)^2}{30} = 254.288$$

II/ Variation totale

$$\begin{aligned} \text{Somme des carrés} &= SX^2 - C = 279.844 - 254.288 = \\ &25.556 \end{aligned}$$

$$DL = 30 - 1 = 29$$

III/ Variation entre groupes

$$\begin{aligned} \text{Somme des carrés} &= \frac{(SA)^2}{10} + \frac{(SB)^2}{10} + \frac{(SC)^2}{10} - C = \\ &\frac{(1034)^2}{10} + \frac{(728)^2}{10} + \frac{(1000)^2}{10} - C = 259.913 - 254.288 \\ &= 5.625 \end{aligned}$$

$$DL = 3 - 1 = 2$$

IV/ A contre B + C

$$\begin{aligned} \text{Somme des carrés} &= \frac{(1034)^2}{10} + \frac{(1728)^2}{20} - C = \\ &256.214 - 254.288 = 1.926 \end{aligned}$$

$$DL = 2 - 1 = 1$$

V/ B contre C

$$\begin{aligned} \text{Somme des carrés} &= \text{entre groupes} - A \text{ contre } B + C = \\ &5.625 - 1.926 = 3.699 \end{aligned}$$

$$DL = 2 - 1 = 1$$

VI/ Variation à l'intérieur des groupes. (Erreur)

$$\begin{aligned} \text{Somme des carrés} &= SX^2 - \left(\frac{(SA)^2}{10} + \frac{(SB)^2}{10} + \frac{(SC)^2}{10} \right) = \\ &279.844 - 259.913 = 19.931 \end{aligned}$$

$$DL = 30 - 3 = 27$$

Tableau d'analyse de variance

Source de variation

	Somme des carrés	DL	Carré moyen	F	5 %	1 %
I- Entres groupes	5.625	2	2.812	3,7	3,35	5,49
II- A contre B + C	1.926	1	1.926	2,61	4,21	7,68
III- B contre C	3.699	1	3.699	5,08	4,21	7,68
IV- Erreur	19.931	27	738			

Il n'y a pas de différence significative entre A et B + C. Il y a une différence significative entre B et C.

Virus Coxsackie B 2

Titres des antigènes pour chacune des dix extractions par méthode.

A		B		C	
T	T2	T	T2	T	T2
32	1024	30	900	16	256
30	900	4	16	50	2500
30	900	4	16	32	1024
16	256	40	1600	8	64
32	1024	8	64	32	1024
50	2500	32	1024	32	1024
16	256	30	900	32	1024
30	900	32	1024	8	64
16	256	4	16	32	1024
32	1024	16	256	16	256
284	9040	200	5816	268	8260

Signification de la différence des titres antigéniques des trois groupes au moyen de l'analyse de variance avec décomposition des effets entre groupes.

Données

$$S X = 284 + 200 + 268 = 752$$

$$S X^2 = 9.040 + 5.816 + 9.260 = 24.116$$

$$n = 10 \times 3 = 30$$

Calculs

I/ Terme de correction = $C = \frac{(SX)^2}{n} = \frac{(752)^2}{n} = 18.850$

II/ Variation totale

$$\text{Somme des carrés} = SX^2 - C = 24.116 - 18.850 =$$

$$DL = 30 - 1 = 29 \quad 5.268$$

III/ Variation entre groupes

$$\begin{aligned} \text{Somme des carrés} &= \frac{(SA)^2}{10} + \frac{(SB)^2}{10} + \frac{(SC)^2}{10} - C = \\ &19.248 - 18.850 = 398 \end{aligned}$$

$$DL = 3 - 1 = 2$$

IV/ A contre B + C

$$\begin{aligned} \text{Somme des carrés} &= \frac{(284)^2}{10} + \frac{(468)^2}{20} - C = \\ &19.017 - 18.850 = 167 \end{aligned}$$

$$DL = 2 - 1 = 1$$

V/ B contre C

$$\begin{aligned} \text{Somme des carrés} &= \text{entre groupes} - A \text{ contre } B + C = \\ &398 - 167 = 231 \end{aligned}$$

$$DL = 2 - 1 = 1$$

VI/ Variation à l'intérieur des groupes (Erreur)

$$\begin{aligned} \text{Somme des carrés} &= SX^2 - \left(\frac{(SA)^2}{10} + \frac{(SB)^2}{10} + \frac{(SC)^2}{10} \right) = \\ &24.116 - 19.248 = 4.868 \end{aligned}$$

$$DL = 30 - 3 = 27$$

Tableau d'analyse de Variance

Source de Variation

	Somme des carrés	DL	Carré moyen	F	5 %	1 %
I. Entre groupes	398	2	199	1,1	3,35	5,49
II. A contre B + C	167	1	167	1	249	6234
III. B contre C	231	1	231	1,2	4,21	7,68
IV. Erreur	4867	27	180			

Il n'y a pas de différence significative entre les titres des antigènes obtenus selon les différentes méthodes.

Virus Coxsackie B 5

Titre des antigènes pour chacune des dix extractions par méthode.

A		B		C	
T	T2	T	T2	T	T2
50	2.500	50	2.500	16	256
50	2.500	30	900	100	10.000
50	2.500	50	2.500	100	10.000
50	2.500	50	2.500	50	2.500
50	2.500	30	.900	50	2.500
50	2.500	30	900	50	2.500
50	2.500	30	900	50	2.500
50	2.500	30	900	50	2.500
30	900	50	2.500	50	2.500
<u>30</u>	<u>900</u>	<u>50</u>	<u>2.500</u>	<u>50</u>	<u>2.500</u>
460	21.800	400	17.000	566	37.756

Signification de la différence des titres antigéniques des trois groupes au moyen de l'analyse de

variance avec décomposition des effets entre groupes.

Données

$$SX = 460 + 400 + 566 = 1.426$$

$$S X^2 = 21.800 + 17.000 + 37.756 = 76.556$$

$$n = 10 \times 3 = 30$$

Calculs

$$I. \text{ Terme de correction} = C = \frac{(SX)^2}{n} = \frac{(1426)^2}{30} = 67.782$$

II. Variation totale

$$\text{Somme des carrés} = SX^2 - C = 8.774$$

$$DL = 30 - 1 = 29$$

III. Variation entre groupes

$$\text{somme des carrés} = \frac{(SA)^2}{10} + \frac{(SB)^2}{10} + \frac{(SC)^2}{10} - C =$$

$$69.195 - 67.782 = 1.413$$

$$DL = 3 - 1 = 2$$

IV. A contre B + C

$$\text{Somme des carrés} = \frac{(460)^2}{10} + \frac{(966)^2}{20} - C = 36$$

$$DL = 2 - 1 = 1$$

V. B contre C

$$\text{Somme des carrés} = \text{entre groupes} - A \text{ contre } B + C$$

$$DL = 2 - 1 = 1 \quad = 1.377$$

VI. Variation à l'intérieur des groupes (Erreur)

$$\text{Somme des carrés} = SX^2 - \left(\frac{(SA)^2}{10} + \frac{(SB)^2}{10} + \frac{(SC)^2}{10} \right) =$$

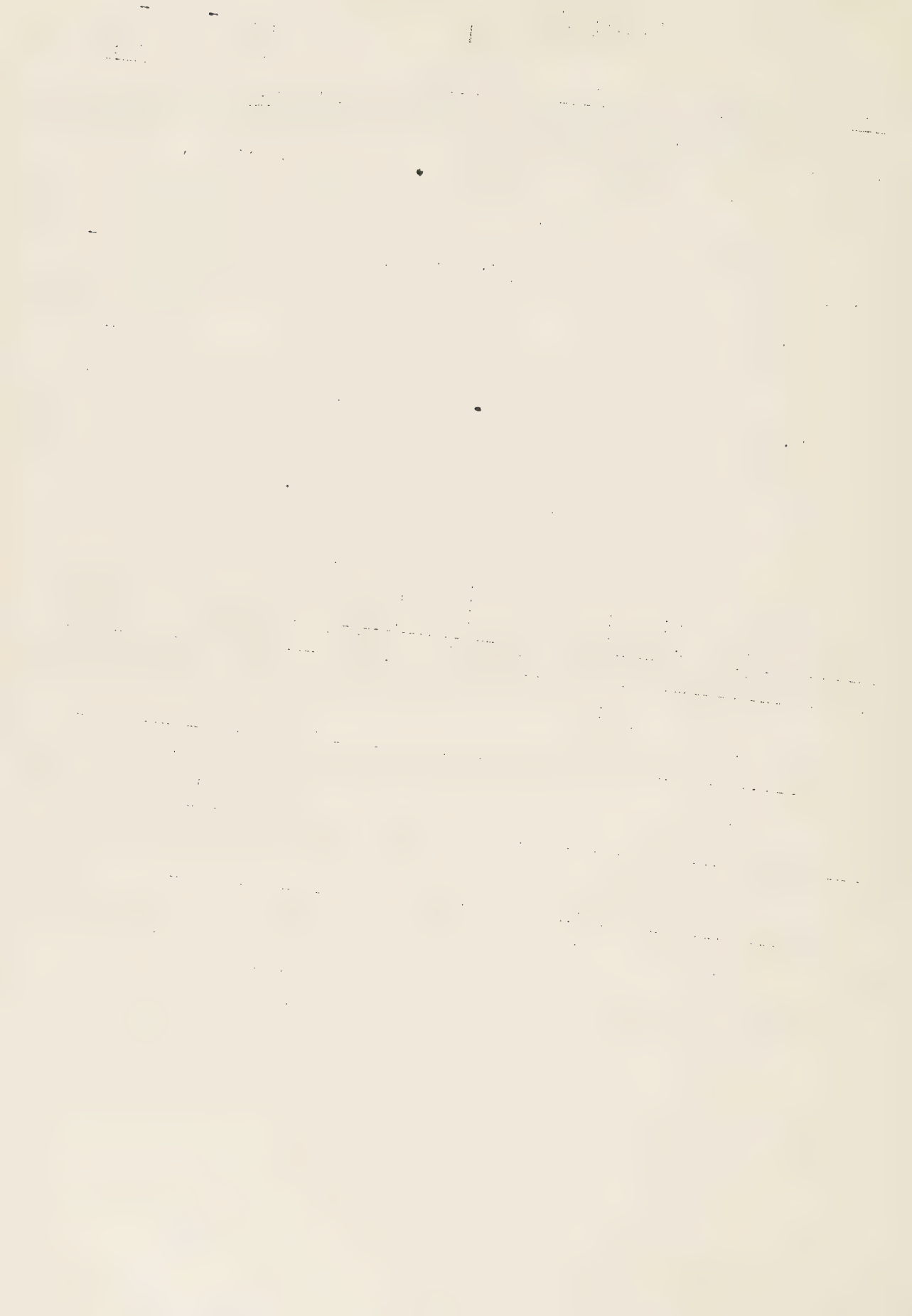
$$76.556 - 69.195 = 7.361$$

$$DL = 30 - 3 = 27$$

Tableau d'analyse de Variance

Source de Variation						
	Somme des carrés	DL	Carré moyen	F	5 %	1 %
Entre groupes	1.413	2	706	2,52	3,35	5,49
. A contre B + C	36	1	36	7,5	249	6234
I. B contre C	1.377	1	1377	5,06	4,21	7,68
. Erreur	7.361	27	272			

Il y a une différence significative entre B et C mais il n'y en a pas entre A et B + C.



		sérum anti A 9	sérum anti A 21	sérum anti A 23	sérum anti Echo 6	sérum anti Echo 12
Coxs. B2	A	!	!	!	!	!
	B	!	!	!	!	!
	C	!	!	!	!	!
	-	!	!	!	!	!
Coxs. B5	A	!	!	!	!	!
	B	!	!	!	!	!
	C	!	!	!	!	!
	-	!	!	!	!	!
Coxs. A9	A	! + ! +	!	!	!	!
	B	! + ! +	!	!	!	!
	C	! + ! +	!	!	!	!
	-	!	!	!	!	!
Coxs. A 21	A	!	! +	!	!	!
	B	!	! +	!	!	!
	C	!	! +	!	!	!
	-	!	!	!	!	!
Antigènes cellulaires K B	1/5	!	!	!	!	!
	1/10	!	!	!	!	!
		!	!	!	!	!
		!	!	!	!	!

V.- Discussion

Si nous examinons les résultats selon les virus

Virus Coxsackie A 21

l'extraction A a donné un titre très faible

l'extraction B n'a pas donné d'antigène titrable

l'extraction C a donné un bon titre

L'analyse statistique montre que l'extraction selon notre méthode de centrifugation à faible vitesse donne des résultats supérieurs de façon hautement significative à l'extraction avec ultra-centrifugation.

Virus Coxsackie A 9

Les trois extractions ont donné de bons titres antigéniques.

Les méthodes sans ultracentrifugation ne diffèrent pas significativement de la méthode avec ultracentrifugation. Notre méthode donne des titres supérieurs significativement à ceux obtenus avec la méthode américaine.

Virus Coxsackie B 2

Les trois extractions ont donné des titres antigéniques moyens et surtout très variables à l'intérieur d'une même méthode. Il n'y a pas de différence significative entre les titres des anticorps obtenus selon les différentes méthodes.

Virus Coxsackie B 5

Les trois extractions ont donné des titres assez bons. Les méthodes sans ultracentrifugation ne diffèrent pas significativement de la méthode avec ultracentrifugation. Notre méthode donne des titres supérieurs à ceux obtenus par la méthode américaine.

Les résultats obtenus avec le virus Coxsackie A 21 nous paraissent anormaux. Nous ne voyons pas quelle est la cause de la différence très importante entre notre méthode et la méthode américaine qui n'en diffère que par la quantité beaucoup plus faible de surnageant dans l'antigène terminé.

•

•

•

•

•

•

•

•

•

•

•

•

•

•

•

•

•

•

•

•

•

•

•

L'on peut émettre l'hypothèse que la fraction antigénique active serait contenue dans le surnageant et n'aurait que très faiblement été concentrée par l'ultracentrifugation de la méthode A. La confirmation ou l'infirmerie de nos résultats concernant le Virus Cocksackie A 21 nécessiteront la reprise de nos essais en beaucoup plus grand nombre, c'est ce que nous nous proposons d'effectuer ultérieurement.

Les autres résultats nous paraissent normaux, il en ressort que notre modification personnelle donne des titres antigéniques constamment supérieurs à ceux obtenus selon la méthode de Schell, Huebner et Turner(7). Cette supériorité est significative pour 3 virus sur 4.

Notre méthode donne des titres supérieurs significativement à la méthode par ultracentrifugation une fois sur quatre. Les trois autres fois, elle n'en diffère pas significativement.

Il nous semble donc que le titre obtenu selon notre méthode vaut celui de la méthode avec ultracentrifugation et est supérieur à celui de la méthode de Schell Huebner et Turner (7), et ceci avec un rendement cinq fois supérieur à celui des deux autres méthodes.

Si l'on ajoute l'avantage important de l'absence d'ultracentrifugation, notre méthode nous paraît représenter un progrès net dans la préparation des antigènes Viraux Cocksackie fixant le complément.

Il nous semble nécessaire, cependant, de traiter la suspension antigénique par le Fréon 112 pour éliminer les antigènes cellulaires KB.

QUATRIEME PARTIE

CONCLUSIONS

Au terme de cette étude, il nous paraît significativement établi que notre méthode de préparation, à partir de cultures cellulaires, d'Antigènes viraux Cocksackie fixant le complément est plus intéressante que les deux autres méthodes étudiées conjointement.

En effet, obtenant des titres antigéniques au moins égaux, souvent supérieurs, nous avons en outre un rendement cinq fois plus élevé en antigène que ceux obtenus selon les deux autres méthodes d'extractions étudiées.

Il nous paraît, bien entendu, nécessaire de compléter ce travail dans deux directions, au moins :

- en multipliant les expériences d'extractions comparées pour vérifier nos résultats en particulier sur le virus Cocksackie A 21.
- en étendant cette expérimentation au plus grand nombre de virus possible .

Ainsi, se trouvera justifié, nous l'espérons, notre travail préliminaire.

CINQUIEME PARTIE

BIBLIOGRAPHIE

- (1)- Dalldorf G et Sickles G.M.
Science 1948 - v. 108, 61
- (2) Melnick J.L., Schaw E.W. et Curnen E.C.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1949, v 71, 344
- (3)- Sylvest E.
Bull. Off. Intern. Hyg. pub. 1932, v 24, 1431
- (4)- Melnick J.L. et Riordan J.T.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 1952, v 81, 208
- (5)- Melnick J.L., Jawetz E., Adelberg E.A.
Review of Medical Microbiology 1966, 323
- (6)- R. Schief
Diagnostic des Maladies à virus, p. 237
- (7)- Concentration of Complement Fixing Viral Antigens.
Klauss Schell, Robert J. Huebner, Horace C. Turner
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1966, v 112, 41-46
- (8)- Pereira H.G., Valentine R.C.
Journal of Microbiology 1958, v 19, p. 178
- (9)- Wilcox W.G., Ginsberg H.S.
Proceeding National Academy of Sciences 1961, v 47
p. 512
- (10) Antigène Poliomyélitique pour fixation du complément
Françoise Artzet. Annales de l'Institut Pasteur 1960
v 99, p. 852
- (11) Diagnostic Sérologique des Infections à Entérovirus
non poliomyélitique.
O G Gaudin, Diagnostic des Maladies à virus, p. 607

TABLE DES MATIERES

<u>Introduction</u>	I
PREMIERE PARTIE	
<u>Généralités</u>	5
I Notions sur les coxsackie virus	5
A) es Virus	5
B) eur Pouvoir pathogène chez l'homme.	8
II Le diagnostic de laboratoire	9
A) Isolement et identification du virus	10
B) Titrage des Anticorps	13
DEUXIEME PARTIE	
<u>Préparation des antigènes</u>	16
I Méthode avec ultracentrifugation	16
II Méthode récente de SCHELL HUEBNER et TURNER	17
III Modification personnelle de cette méthode.	18
TROISIEME PARTIE	
<u>Etude expérimentale comparée de ces trois méthodes</u>	20
I Plan de l'expérience	20
II Matériel	22
III Techniques	23
IV Résultats	25
V Analyses des résultats	26
VI Discussion	35
QUATRIEME PARTIE	
Conclusion	39
CINQUIEME PARTIE	
Bibliographie	40

